ساخت نانوبیوماده‌ی مرکب سه جزئی هیدروکسی آپاتایت، آلومینا و تیتانیا به‌روش تف‌جوشی و بررسی زیست‌فعّالی و سمیّت سلولی آن برای کاربردهای اُرتوپدی*

محبوبه محمودی[۱]		پیمان محمودی هاشمی[۲]		رعنا ایمانی[۳]

چکیده

در این مطالعه، دو نانوبیوماده‌ی مرکب پایه سرامیکی از جنس هیدروکسی آپاتایت (HA)، Al_2O_3 و TiO_2 با خواص زیست‌سازگاری و مکانیکی قابل توجه و قابلیّت تشکیل آپاتایت بر روی سطح، با روش فشردن سرد و تف‌جوشی ساخته شد. استحکام فشاری نمونه‌های تولیدی ارزیابی شد. نتایج حاصل از آزمون تعیین استحکام، افزایش استحکام فشاری نمونه‌ی A (حاوی ۵۰ درصد وزنی ذرات تیتانیا، ۳۰ درصد وزنی هیدروکسی آپاتایت و ۲۰ درصد وزنی آلومینا) را نسبت به نمونه‌ی B (حاوی ۵۰ درصد وزنی ذرات هیدروکسی آپاتایت، ۳۰ درصد وزنی ذرات تیتانیا و ۲۰ درصد وزنی آلومینا) نشان دادند. افزون بر این، از نتایج آزمون تعیین تخلخل نتیجه شد که نمونه‌ی A دارای تخلخل کم‌تری نسبت به نمونه‌ی B می‌باشد. برای بررسی زیست‌فعّالی، نمونه‌ها به‌مدّت زمان ۷ روز در محلول شبیه‌سازی شده‌ی بدن (SBF) غوطه‌ور شدند. نتایج حاصل از این آزمون نشان دادند که نمونه‌ی B توانایی بیش‌تری را برای تشکیل ترکیبات نوع کلسیم فسفات بر روی سطح نسبت به نمونه‌ی A دارد. هم‌چنین، آزمون‌های آزمایشگاهی برون تنی و تعیین سمیّت سلولی (MTT)، چسبیدن و پهن‌شدگی سلول‌های MG-67(استئوبلاست) را بر روی سطح نمونه‌ها نشان دادند. از نتایج این آزمون‌ها، افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی نمونه‌ی B نسبت به نمونه ی A نتیجه شد. در نهایت، آزمون پراش پرتوی ایکس (XRD)، بررسی‌های میکروسکُپ الکترونی روبشی (SEM)، آزمون تعیین عنصر (ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS (EDX) و آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، به‌ترتیب برای شناسایی فازها، مطالعه‌ی ریزساختار، تعیین درصد عناصر و شناسایی پیوندهای تشکیل شده در نمونه‌ها انجام شدند. افزون بر این، برای جلوگیری از ایجاد ریزترک و تشکیل فازهای ثانویه، عملیّات تف‌جوشی نمونه‌ها در دمای °C ۱۰۰۰ انجام شد. نتایج آزمایش‌ها نشان دادند که هر دو نانوبیوماده ی مرکب، با توجه به خواص متفاوتی که دارند، می‌توانند برای کاربرد به‌عنوان ماده‌ی کاشتنی در دندان‌پزشکی و اُرتوپدی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی نانوبیوماده‌ی مرکب، تف‌جوشی، هیدروکسی آپاتایت، تیتانیا، آلومینا، زیست‌فعّالی، سمیّت سلولی.

Fabrication of TiO_2-Al_2O_3-HA Nanobiocomposite by Sintering and Evalution of in Vitro Bioactivity and Cell Toxicity for Orthopedic Applications

M. Mahmoodi		P. M. Hashemi		R. Imani

Abstract

For the purposes of this study, Hydroxyapatite (HA)-Al_2O_3-TiO_2 nanobiocomposites with significant mechanical properties, biocompatibility and capability to form surface apatite were fabricated by cold pressing and sintering. Samples were examined for their compressive strengths. The results of compression experiments showed that sample A (50 wt.% TiO_2-30 wt.% HA- 20 wt.% Al_2O_3) was superior compared with sample B (30 wt.% TiO_2-50 wt.% HA- 20 wt.% Al_2O_3). In addition, the examination of porosity in samples' surfaces showed that sample A has less prosity than sample B. In vitro bioactivity of the nanobiocomposites in a simulated body fluid (Simulated Body Fluid (SBF)) was also investigated. After immersing the samples in the SBF solution for 7 days, sample B exhibited greater ability to form calcium phosphate compounds on the surface. In vitro studies showed that MG-67 osteoblast-like cells were attached and spread on the samples' surfaces. The results showed that cells proliferated in greater numbers on the B sample compared to the A sample. Finally, X-Ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopic examinations, energy-dispersive X-ray Analysis (EDX), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were performed in order to identify different phases, to study the microstructures, to determine concentration of different elements, and to identify the bonds formed in samples, respectively. To prevent the formation of microcracks and secondary phases, sintering operation was conducted at 1000 °C. Based on the results obtained and considering desirable properties of samples, both nanobiocomposites can be used in dental implants and orthopedic applications.

Key Word Nanobiocomposite, Sintering, Hydroxyapatite, Alomina, Titania, Bioactivity, Cell toxicity.

---

* نسخه‌ی نخست مقاله در تاریخ ۹۲/۷/۱ و نسخه‌ی پایانی آن در تاریخ ۹۳/۵/٦ به دفتر نشریه رسیده است.

(۱) نویسنده‌ی مسئول، استادیارگروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی.

(۲) دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، پردیس علوم و تحقیقات یزد، دانشگاه آزاد اسلامی.

(۳) دانشجوی دکتری، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی.

مقدمه

توسعه‌ی بیومواد جدید برای کاربردهای درمانی، یکی از دغدغه های اصلی محققان می‌باشد. ارتوپدی، یکی از دسته علومی است که به‌منظور التیام و جای‌گزینی اجزای از بین رفته، معمولاً به چنین موادی نیاز دارد [1,2]. امروزه، مواد مصنوعی مختلف از جمله مواد مرکب، به‌عنوان جای‌گزین استخوان برای غلبه بر مشکلات مربوط به ترمیم عیب‌های استخوان، به‌کار می‌روند [3-5]. استخوان یک ماده‌ی مرکب طبیعی است که بخش معدنی آن را هیدروکسی آپاتیت کربناتی تشکیل می‌دهد و با الیاف کِلاژن تقویت شده است [6-8]. در بسیاری از شکستگی‌ها و عیب‌های استخوانی، به مواد جای‌گزین یا پر کننده برای ترمیم بافت استخوان نیاز است. بنابراین، نمی‌توان ماده‌ای را یافت که به‌تنهایی خواص شیمیایی و مکانیکی استخوان را داشته باشد. مواد مرکب بیوپزشکی، اغلب به‌منظور فراهم کردن زیست‌سازگاری و رفتار مکانیکی مناسب طراحی می‌شوند [9,10].

هیدروکسی آپاتایت (HA)، سرامیکی است که برای کاشتنی‌های اُرتوپدی و دندانی استفاده می‌شود. این ماده، یک سرامیک زیست‌سازگار است که از نظر ترکیب شیمیایی بسیار شبیه به بخش معدنی استخوان و دندان است. این ماده می‌تواند پیوند مناسبی با بافت استخوانی برقرار کند. البته، کاربرد هیدروکسی آپاتایت به‌دلیل چقرمگی و استحکام خمشی پایین، در محل‌های تحت بار مکانیکی محدود است [11-13]. به‌همین دلیل، از آن به‌عنوان پر کننده در نقص‌های کوچک استخوانی و پوشش بر روی ایمپلنت‌های فلزی مانند تیتانیم، استفاده می‌شود [14,15]. در تحقیقات اخیر، بهبود فرایند استخوان‌سازی و تثبیت کاشتنی‌ها به‌روش‌های گوناگون از جمله پلاسما اسپری و لیزر گزارش شده است [16-18].

امروزه، تولید مواد مرکب با هیدروکسی آپاتایت در ابعاد نانومتری، امکان طرّاحی مواد نوین با ساختاری شبیه به استخوان را فراهم آورده است. چنین مواد نوینی، یکنواختی شیمیایی بالایی در پوشش‌ها ایجاد می‌کند و تولید مواد مرکب چگال در دمای تف‌جوشی پایین را میسر می‌سازد، ولی ساخت مواد مرکب هیدروکسی آپاتایت در دماهای بالا، عمل‌کرد آن‌ها را محدود می‌کند، زیرا در اثر وقوع واکنش‌های سطحی بین هیدروکسی آپاتایت و ماده‌ی تقویت کننده در ماده‌ی مرکب در فرایند ساخت آن در دماهای بالا، فازهای جدیدی تشکیل می‌شوند که بر خواص آن تأثیر می‌گذارد. افزون بر این، فازهای کلسیم فسفات مانند تری کلسیم فسفات (TCP) و ترا کلسیم فسفات (TTCP) که فازهایی ترد با استحکام کم می‌باشند، در نتیجه‌ی تجزیه‌ی هیدروکسی آپاتایت به‌وجود می‌آیند که سبب تضعیف خواص مکانیکی آن می‌شود [19,20]. مواد مرکب زیست فعال با تشکیل لایه‌ی هیدروکسی آپاتایت بر روی سطح خود، می‌توانند به استخوان زنده متّصل شوند. بنابراین، در گزارش‌های اخیر، مواد مرکب بر پایه‌ی هیدروکسی آپاتایت با تقویت کننده‌هایی مانند TiO_2، Al_2O_3 و Zro_2 برای بهبود خواص مکانیکی هیدروکسی آپاتایت، علاقه‌ی محققین را به خود جلب کرده است [21-24]. بیوسرامیک Al_2O_3 (آلومینا)، مقاومت به سایش و چقرمگی شکست را افزایش می‌دهد، در حالی‌که زیست‌سازگاری به‌دلیل ماهیّت خنثی بودن آن، حفظ میشود. افزون بر این، این ماده قادر است تا مقاومت حرارتی مواد مرکب را به‌طور چشم‌گیری افزایش دهد [21].

TiO_2 (تیتانیا) تقویت کننده‌ی متداول دیگری در مواد مرکب است. حضور این بیوسرامیک در حالی‌که زیست‌سازگار، ضدباکتریال و فوتوکاتالیست است، موجب افزایش مقاومت به خوردگی مواد کاشتنی نیز می‌شود [25]. افزون بر این، اضافه شدن TiO_2 به‌عنوان تقویت کننده در مواد مرکب هیدروکسی آپاتایت بر ساختار آن‌ها تأثیر می‌گذارد و خواص بهبود می‌یابند [26]. اخیراً گزارش‌هایی مبنی بر ساخت مواد مرکب $Ag–TiO_2/HA/Al_2O_3$ به عنوان غشاء [27] و Al_2O_3/TiO_2 [28]، HA/TiO_2 [29] و HA/Al_2O_3 [30] برای کاربردهای پزشکی ارائه شده‌اند، امّا گزارش‌ها و مقاله‌های مرتبط با ساخت مواد مرکب سه فازی -HA

TiO_2-Al_2O_3برای کاربردهای پزشکی محدودند.

Al_2O_3یکی از بهترین تقویت کنندهها در مواد مرکب بیوسرامیکی HA میباشد، ولی بهدلیل ایجاد فازهای جدید در فصل مشترک آنها در دماهای بالاتراز ۱۲۰۰ °C تا ۱۴۰۰ °C، کاربرد آن محدود شده است. در برخی از موارد، شکلگیری فازهای جدید هنگام ساخت مواد مرکب سبب افت خواص مکانیکی و حتّی خواص بیولوژیکی مادهی مرکب میشود. بنابراین، باید توجه داشت که ساخت مادهی مرکب در دماهای بالای تفجوشی باعث ایجاد تغییرات فازی زیادی در آن میشود [30].

هیدروکسی آپاتایت بهطور گسترده بهعنوان بیوماده در کاربردهای پزشکی استفاده میشود. این ماده بهتنهایی میتواند بیواکتیویته و تمایل به جذب مواد زیستی نظیر پروتئین را افزایش دهد، امّا از نقطه نظر خواص مکانیکی (چقرمگی شکست) و استحکام چسبندگی هنگام پوششدهی بر روی زیر لایهی تیتانیمی، ضعیف است. در تحقیقات انجام شده گزارش شده است که حضور TiO_2 در کنار هیدروکسی آپاتایت در مادهی مرکب پوشش داده شده بر روی زیر لایهی تیتانیمی، نه تنها سبب افزایش استحکام چسبندگی به زیر لایه میشود، بلکه مقاومت به خوردگی تیتانیم را نیز افزایش میدهد [23]. افزون بر این، بدون اینکه توانایی تشکیل آپاتایت به خطر بیافتد، سختی سطح را نیز افزایش میدهد. حضور Al_2O_3 در سطح مادهی مرکب، در فرایند کَلسینه شدن تأثیری نخواهد داشت. از سوی دیگر، چقرمگی شکست و استحکام هیدروکسی آپاتایت با افزوده شدن ۲۰ درصد Al_2O_3 به آن، تا دو برابر افزایش مییابد [30]. TiO_2 بهعنوان تقویت کننده بهکار رفته در مادهی مرکب، قابلیّت جذب آب و تشکیل گروههای Ti-OH بر روی سطح را دارد و این در نهایت، منجر به تشکیل هستههای آپاتایت و بلورین در محلول شبیه سازی شده بدن Simulated Body Fluid (SBF) میشود. بنابراین، این تقویت کننده در چسبندگی استخوان به قطعهی کاشتنی نقش مؤثری را بازی میکند [26]. هدف از انجام این تحقیق، ساخت، مقایسهی خواص، زیستفعّالی و زیستسازگاری دو نانوبیومادهی مرکب سه فازی HA-TiO_2-Al_2O_3 با درصدهای وزنی متفاوت هیدروکسی آپاتایت و TiO_2 در دمای پایین تفجوشی برای کاربرد در کاشتنیهای دندانپزشکی و اُرتوپدی میباشد.

مواد و روشهای آزمایش

ساخت نانوبیومادهی مرکب

برای ساخت نانو بیومادهی مرکب، یک قالب استوانهای از جنس فولاد بهقطر ۲ cm بهمنظور فشردن سرد مواد اولیّه بهکار رفت. سپس، پودرهای رُتیل TiO_2، α-Al_2O_3 و هیدروکسی آپاتایت بهترتیب با اندازههای ۸۰ nm، ۲۰ nm و ۲ µm بهعنوان مواد اولیّهی تشکیل دهندهی بیومادهی مرکب و چسب سیلیکات سدیم برای افزایش چسبندگی ذرات، از شرکت مِرک خریداری شد. دو نمونه با درصدهای وزنی متفاوت مطابق با جدول (۱)، ساخته شد. در نمونهی B، ذرات هیدروکسی آپاتایت با ۵۰ درصد وزنی بهعنوان فاز زمینه و ذرات تیتانیا و آلومینا بهعنوان فاز تقویت کننده، بهترتیب با ۳۰ و ۲۰ درصد وزنی ترکیب شدند. نمونهی A با ۵۰ درصد وزنی ذرات تیتانیا بهعنوان فاز زمینه و بهترتیب با ۳۰ و ۲۰ درصد وزنی ذرات هیدروکسی آپاتایت و آلومینا بهعنوان فاز تقویت کننده، مخلوط شد.

جدول ۱ درصد وزنی مواد تشکیل دهندهی نانوبیومادهی مرکب

نمونه	Al_2O_3 (%)	TiO_2 (%)	HA (%)
A	۲۰	۵۰	۳۰
B	۲۰	۳۰	۵۰

برای ساخت نانوبیومادهی مرکب، ابتدا پودرها با درصدهای وزنی متفاوت (جدول ۱) با سیلیکات سدیم مخلوط شدند و برای رسیدن به یکنواختی بیشتر، بهمدّت ۱۰ دقیقه بههم زده شدند. سپس، ٤ گرم از پودر مخلوط شده درون قالب استوانهای ریخته شد و مخلوط توسط پرس سرد تکمحوری با فشار

معادل $150\ kg/cm^2$ (۱٤/۷ MPa) فشرده شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌های به‌دست آمده به‌مدّت ۲ ساعت در کوره‌ای با دمای $150\ ^{o}C$ خشک شدند. برای افزایش استحکام ماده‌ی مرکب، نمونه‌ها در دمای $1000\ ^{o}C$ به‌مدّت ٤۰ دقیقه تف‌جوشی و سپس، تا دمای اتاق سرد شدند.

بررسی ریزساختار نمونه‌ها

ریزساختار نمونه‌ها توسط میکروسکُپ الکترونی روشی (SEM) نوع SEM, VEGA II, Tescan, USA بررسی شد. تصویرهای سطح مقطع افقی نمونه‌ها قبل و بعد از قرارگیری در محلول SBF (مایع شبیه‌سازی شده‌ی بدن)، در بزرگنمایی‌های مختلف به‌دست آمد. افزون بر این، درصد عناصر موجود در نمونه‌ها با انجام آزمون ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS (EDX) و نحوه‌ی توزیع عناصر در آن‌ها، با انجام آزمون نقشه پرتو ایکس (X-RAY MAP) ازریابی شد.

اندازه‌گیری تخلخل ظاهری و چگالی نمونه‌ها

چگالی حجمی و تخلخل ظاهری نمونه‌های تف‌جوشی شده، توسط روش اَرشمیدس اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمایش، نمونه‌ها در آب غوطه‌ور شدند و چگالی آن‌ها با استفاده از پیکنومتر محاسبه شد [31].

استحکام فشاری

به‌منظور انجام آزمون فشار، نمونه‌ها به‌شکل استوانه‌هایی به‌ارتفاع ۱۵ و قطر ۲۰ میلی‌متر تهیّه شدند و پس از تف‌جوشی در دمای $1000\ ^{o}C$، در دستگاه کشش- فشار یونیورسال (STM Series) قرار داده شدند. نمونه‌های استوانه‌ایی به‌صورت تک‌محوری با سرعت جابجایی فک برابر با ۰/۵ میلی‌متر بر دقیقه فشرده شدند. برای هر آزمون فشار، ۵ نمونه تحت آزمایش قرار گرفتند و مقدار میانگین به‌دست آمده، به‌عنوان استحکام فشاری گزارش شد.

الگوی پراش پرتوی ایکس از نمونه‌ها

آزمون تعیین الگوی پراش پرتوی ایکس (XRD) (Philips, X'PertPro) با هدف شناسایی فازهای تشکیل شده در نمونه‌های ماده‌ی مرکب و بررسی میزان بلورینگی آن‌ها انجام گرفت. فازهای موجود در نمونه‌ها به‌کمک نرم افزار (Panalytical Soft ware X′) Pert High score Plus و پوشه‌ی PDF-2 [32] مشخص شدند.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

برای شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل شده در ماده‌ی مرکب ساخته شده، از طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) در محدوده‌ی cm^{-1} ٤۰۰-٤۰۰۰ (FT-IR Spectrometers ساخت شرکت Bruker) استفاده شد. ابتدا نمونه‌های A و B با پودر KBr (با نسبت KBr =۱/۱۰۰ / نمونه) آسیا شدند و پس از آن با استفاده از دستگاه فشار، نمونه‌هایی به‌شکل قرص نازک تهیّه و در دستگاه FTIR برای بررسی پیوندهای ایجاد شده قرار داده شدند.

غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول SBF

به‌منظور ارزیابی رفتار زیست‌فعّالی نانوبیوماده‌ی مرکب در محیط آزمایشگاه، محلول SBF با استفاده از دستورالعمل ارائه شده توسط کوکوبو (KOKUBO)، آماده‌سازی شد [33]. در جدول (۲)، ترکیب‌های SBF که شبیه به پلاسمای خون انسان است، مشاهده می‌شود. نمونه‌ها پس از تف‌جوشی، در ٦۰ میلی‌لیتر مایع شبیه‌سازی شده‌ی بدن غوطه‌ور شدند و به‌مدّت ۷ روز در اَنکوباتور در دمای مشابه با دمای بدن ($^{\circ}C$ ۳۷)، با ۹۸ درصد رطوبت و حضور ۵ درصد گاز CO_2 قرار گرفتند. افزون بر این، هر روز محلول SBF بر روی نمونه‌ها با محلول تازه جای‌گزین می‌شد. در نهایت و پس از پایان آزمایش، مُرفولوژی سطحی نمونه‌ها با استفاده از میکروسکُپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد.

جدول ۲ غلظت یون‌های محلول SBF و پلاسمای خون انسان (mmol/L)

نمونه	Na^{+}	K^{+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	HCO_3^{-}	Cl^{-}	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
SBF	۱٤۲/۰	۰/۵	۲/۵	۱/۵	٤/۲	۱٤۷/۸	۱/۰	۰/۵
پلاسمای خون	۱٤۲/۰	۰/۵	۲/۵	۱/۵	۲۷/۰	۱۰۳/۰	۱/۰	۰/۵

آزمون کشت سلول در محیط آزمایشگاه

برای انجام آزمون تعیین سمیّت سلولی و تعیین تکثیر سلولی، از رده‌ی سلولی MG67 تهیّه شده از اَنیستیتو پاستور ایران استفاده شد. با توجه به ابعاد نمونه‌های آزمون، از صفحه‌ی کشت سلول ۲٤ خانه استفاده شد. محیط کشت سلول مورد استفاده، DULBECO'S MODIFIED EAGGLE MEDIUM (DMEM) به‌همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS بود [34]. ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سرم، درون چاهک‌های مورد نظر ریخته شد و پس از آن، نمونه‌های A و B که در اتوکلاو استریل شده بودند، درون این چاهک‌ها قرار داده شدند. پس از کسب اطمینان از غوطه‌وری کامل نمونه‌ها درون محیط کشت و قرارگیری صحیح آن‌ها به‌نحوی که بیش‌ترین فضای ممکن از کف چاهک را بپوشانند، تعداد ۳۰۰۰۰ سلول به‌همراه ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سرم به چاهک‌ها اضافه شد. در این آزمون، یک چاهک بدون نمونه و حاوی همین تعداد سلول به‌عنوان کنترل منفی، در نظر گرفته شد. نمونه‌ها به‌همراه سلول‌ها به‌مدّت ۳ روز درون اَنکوباتور با ۵ درصد CO_2 و ۹۸ درصد رطوبت قرار داده شدند و محیط کشت آن‌ها یک روز در میان عوض می‌شد.

مُرفولوژی سلول‌ها

مُرفولوژی سلول‌ها پس از مدّت ۳ روز کشت، با استفاده از میکروسکُپ الکترونی روبشی بررسی شد. به‌همین منظور، پس از طی زمان ۷۲ ساعت از تماس نمونه‌ها و سلول‌ها، محیط کشت تخلیه شد و نمونه‌ها تحت شرایط استریل از درون ظرف کشت خارج و به ظرف دیگری برای انجام فرایند تثبیت سلول‌ها منتقل شدند. برای تثبیت سلول‌ها، از محلول گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با بافِر فسفات استریل دو مرتبه شسته شدند. سپس، هر نمونه درون ۲ میلی‌لیتر محلول گلوتارآلدهید به‌مدّت ۱/۵ ساعت قرار داده شد. نمونه پس از خروج از درون گلوتارآلدهید، دوباره با بافِر فسفات شسته شد و در ادامه، فرایند آب‌گیری از نمونه‌ها انجام شد. آب‌گیری از نمونه‌ها، با استفاده از محلول الکل اِتانول با غلظت‌های به‌ترتیب ٦۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد انجام شد. نمونه‌ها به‌ترتیب در ۲ میلی‌لیتر از محلول‌های الکل به‌مدّت زمان ۵ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت، در الکل ۱۰۰ درصد به‌مدّت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از انجام آب‌گیری، رطوبت سطحی نمونه‌ها در هوای محیط گرفته شد و نمونه‌ها در دمای ٤ °C تا زمان انجام آزمون، نگه‌داری شدند [34].

آزمون تعیین میزان رشد و سمیت سلولی (MTT)

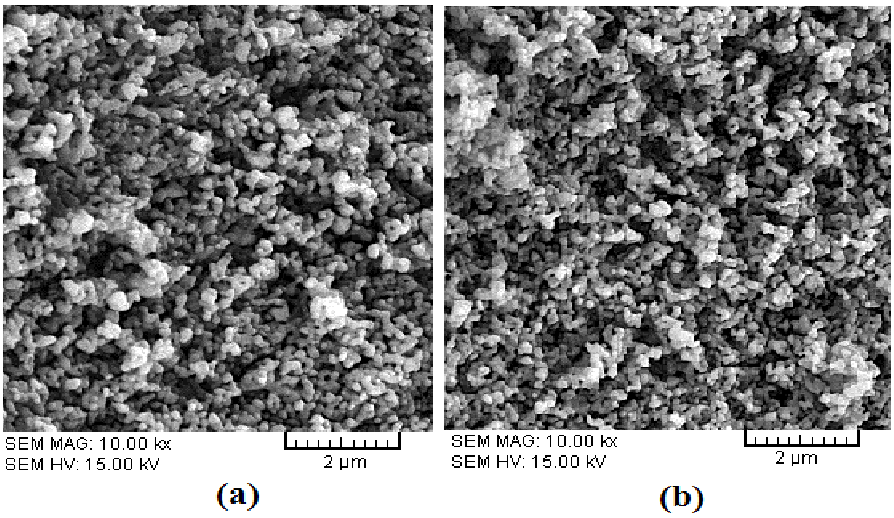
میزان تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های استئوبلاست رده سلولی (MG67) روی سطح نمونه‌ها توسط آزمون MTT ارزیابی شد. به‌همین منظور، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک‌های حاوی نمونه و کنترل اضافه شد. پس از گذشت ٤ ساعت قرارگیری در اَنکوباتور، محیط کشت تخلیه شد و ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفُکسید(Dimethyl Sulfoxide ,DMSO) جای‌گزین شد. ۱۰ دقیقه زمان برای حل شدن بلورهای رنگِ تشکیل شده کافی بود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر محلول از هر چاهک برداشته شد و درون

صفحه‌ی با ۹٦ چاهک قرار گرفت. جذب نوری چاهک‌ها، با استفاده از دستگاه الایزاریدر (BioTek, Elx808, USA) با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد [35]. آزمون‌های آماری در این مقاله، به‌کمک نرم‌افزار اِکسِل با روش روش تجزیه و تحلیل آماری One-Way ANOVA انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی مُرفولوژی و خواص مکانیکی نمونه‌ها

مواد مرکب پیشرفته با چگالی کم، استحکام مکانیکی بالا و زیست‌سازگاری عالی، به‌عنوان کاشتنی‌های مناسب در کاربردهای اُرتوپدی و دندانپزشکی به‌کار برده می‌شوند. با مشاهده‌ی تصویرهای SEM، ریزساختار و مُرفولوژی سطح نمونه‌های نانوبیومادهٔ مرکب A و B بررسی شدند. تصویرهای شکل (۱)، نشان می‌دهند که سطح هر دو نمونه کاملاً تف‌جوشی شده است. بنابراین، ذرات به‌خوبی با یکدیگر اتصال برقرار کرده‌اند و نمونه‌ها از تراکم و تخلخل مناسبی برخوردارند. البته، اندازه‌ی ذرات پس از تف‌جوشی متغیر است. اندازه‌ی میانگین تخلخل در سطح نمونه‌های A و B برابر با ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر است. تفاوت موجود در ضریب انبساط حرارتی مواد تشکیل‌دهنده‌ی ماده‌ی مرکب حین حرارت‌دهی و سرد کردن، می‌تواند منجر به تشکیل ریزترک در آن‌ها شود [36]. در این مطالعه، برای جلوگیری از تشکیل ریزترک، نمونه‌ها در دمای ۱۰۰۰ °C به‌مدّت ٤۰ دقیقه تف‌جوشی شدند. همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود، هیچ‌گونه ترکی در سطح نمونه‌ها وجود ندارد. در جدول (۳)، درصد وزنی عناصر شیمیایی موجود در سطح نانوبیومواد مرکب مشاهده می‌شود.



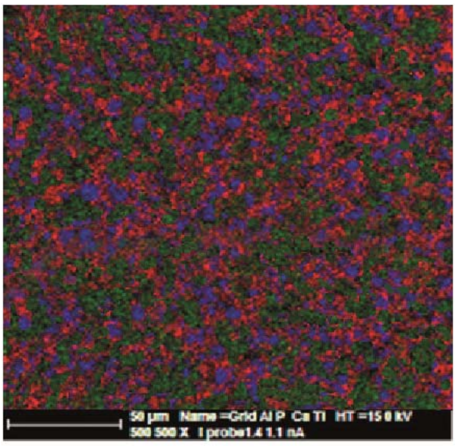
شکل ۱ تصویرهای SEM از نمونه‌ی A (a) و نمونه‌ی B (b) قبل از غوطه‌وری در محلول SBF

جدول۳ درصد وزنی عناصر شیمیایی در سطح نمونه‌ها قبل از غوطه‌وری در محلول SBF

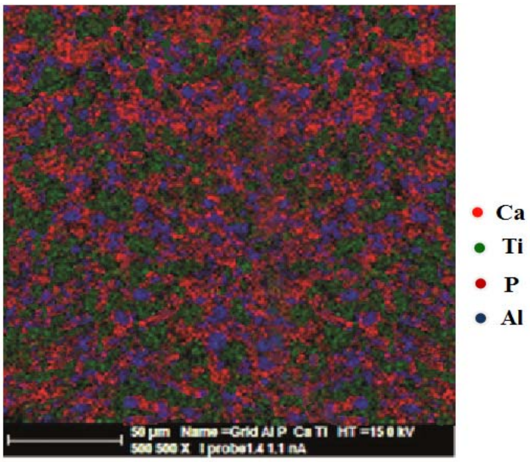
نمونه	Ca (wt.%)	Ti (wt.%)	O_2 (wt.%)	P (wt.%)	Al (wt.%)
A	۷/۷٦	۲٦/۵۳	۵۳/۷۷	٤/٤۵	۷/٤۹
B	۱۳/٤۳	۱۸/۹۱	۵۳/۳۸	۷/۱	۷/۱۸

از طرفی، تصویرهای نقشه پرتو ایکس (X-RAY MAP) نشان می‌دهند که عناصر تشکیل‌دهنده نانوبیومادهٔ مرکب (Ca ,P ,Ti و Al) در تمام ساختار به‌صورت یکنواخت پراکنده شده‌اند و یکنواختی خواص در نواحی مختلف نمونه برقرار شده است (شکل ۲). درصد تخلخل و چگالی نمونه‌ها، در جدول (٤) مشاهده می‌شود. نمونه‌ی B دارای توزیع اندازه‌ی ذرات بهتر، سطح یکنواخت‌تر و درصد تخلخل بیش‌تری (٤١/٩٩ درصد) نسبت به نمونه‌ی A (با تخلخل ٣١/٣٠ درصد) می‌باشد. در نتیجه، در نمونه‌ی B با افزایش درصد تخلخل، فضای خالی برای رشد و تغذیه‌ی سلول‌های استخوانی فراهم می‌باشد و با افزایش میزان هیدروکسی آپاتایت در آن، خاصیّت بیواکتیویته و استئوکنداکتیویته این ماده‌ی کاشتنی افزایش می‌یابد [37]. افزون بر این، نمونه‌های A و B به‌ترتیب دارای چگالی ٢/٠١٦ و ١/٩٩٤ گرم بر سانتی‌متر مکعب می‌باشند. بنابراین، چگالی هر دو نمونه بسیار نزدیک به چگالی استخوان ($1/85\ gr/cm^3$) می‌باشد. البته، چگالی نمونه‌ی A به‌دلیل به‌کار بردن TiO_2 در آن در مقایسه با نمونه‌ی B اندکی افزایش یافته است. استفاده از ذرات هیدروکسی آپاتایت به‌عنوان فاز زمینه و افزودن ذرات تیتانیا و آلومینا به‌عنوان فاز تقویت‌کننده به‌ترتیب به‌میزان تا ٣٠ و ٢٠ درصد وزنی در نمونه‌ی B، باعث بهبود زیست‌فعّالی ماده‌ی کاشتنی در مناطقی که نیاز به بهبود فرایند استخوان‌سازی و تثبیت ماده‌ی کاشتنی و افزایش چسبندگی بیوماده‌ی مرکب به استخوان می‌باشد، می‌شود.

نتایج حاصل از آزمون فشار بر روی نمونه‌های نانوبیومادهٔ مرکب A و B، در شکل (٣) نشان داده شده‌اند. استحکام شکست فشاری نمونه‌های A و B به‌ترتیب برابر با ٣ MPa و ٢/٧ MPa می‌باشد. اندازه‌ی ذرات و نحوه‌ی توزیع مواد تشکیل‌دهنده‌ی مواد مرکب در استحکام آن‌ها مؤثرند. نمونه‌ی A به‌دلیل دارا بودن درصد وزنی بالاتری از TiO_2 و اندازه‌ی ذرات در حد نانو که باعث پرشدن حفره‌ها و فضاهای خالی بین ذرات می‌شود، دارای با مدول یانگ ٦٤MPa نسبت به نمونه B با مدول یانگ ٣٩Mpa دارای استحکام بالاتری می‌باشد. از طرف دیگر، کاهش استحکام و مدول یانگ نمونه‌ی B نسبت به نمونه‌ی A را می‌توان به تشکیل بیش‌تر فاز بتا- تری‌کلسیم فسفات نسبت داد.



(a)

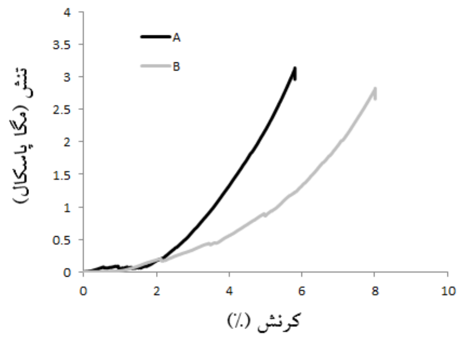


(b)

شکل ۲ تصویرهای نقشه پرتو ایکس (X-RAY MAP) از نمونه‌ی A (a) و نمونه‌ی B (b)

جدول ٤ درصد تخلخل و چگالی نمونه‌ها

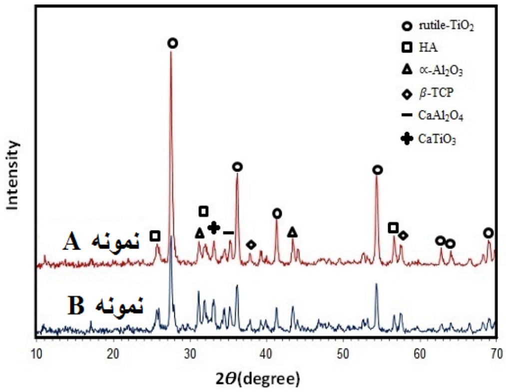
نمونه	تخلخل ظاهری (%V)	چگالی (gr/cm^3)
A	٣١/٣٠	٢/٠١٦
B	٤١/٩٩	١/٩٩٤



شکل ۳ نمودار تنش- کرنش نمونه‌ها

بررسی‌های ریزساختاری

صفحه‌های بلوری و فازهای موجود در نمونه‌ها به‌کمک آزمون پراش پرتوی ایکس (XRD) تعیین شد. با انجام این آزمون، فازهای موجود در نمونه‌های A و B قبل از قرارگیری در محلول SBF مشاهده شد (شکل ٤). قلّه‌های مربوط به هیدروکسی آپاتیت در نزدیکی‌های زاویه‌های $2\theta = ۲٦^{\circ}$ و $2\theta = ۳۲^{\circ}$، به‌ترتیب در صفحه‌های (۲۰۱) و (۲۱۱) آشکار می‌شود. افزون بر این، پیک β-TCP در نزدیکی زاویه‌ی $۳۱/۵^{\circ}$ = 2θ و در صفحه‌ی (۲۲۱) دیده می‌شود که بسیار نزدیک به پیک مربوط به هیدروکسی آپاتیت است. پیک مربوط به TiO_2 با دامنه‌ی بزرگ، در اطراف زاویه‌ی $2\theta = ۳٦^{\circ}$ با صفحه‌ی بلوری (۱۱۰) مشاهده می‌شود. دامنه‌ی پیک TiO_2 در نمودار پراش پرتوی ایکس مربوط به نمونه‌ی A بلندتر است. آلومینا، تقویت‌کننده‌ی دیگری در نانوبیوماده‌ی مرکب است که در نزدیکی‌های زاویه‌های $2\theta = ۳۸^{\circ}$ و $2\theta = ۵۸^{\circ}$، دارای صفحه‌های بلوری (۱۱۰) و (۱۱٦) می‌باشد. افزون بر این، فاز آلومینات کلسیم ($CaAl_2O_4$) در زاویه‌های $2\theta = ۳۵/۵^{\circ}$ و $2\theta = ۵۷^{\circ}$ و فاز $CaTiO_3$ در نزدیکی زاویه‌ی $2\theta = ۳۲/۵^{\circ}$ در هر دو نمونه، دارای پیکی با دامنه‌ی کوتاه می‌باشد. فصل مشترک بین هیدروکسی آپاتیت، Al_2O_3 و TiO_2 با تشکیل فازهای جدید $CaTiO_3$، $CaAl_2O_4$ و β-TCP ایجاد می‌شود [۱۹]. نتایج نشان می‌دهند که پس از ٤۰ دقیقه تف‌جوشی هر دو نمونه در دمای $۱۰۰۰\ ^{\circ}C$، تنها مقدار ناچیزی از فازهای β-TCP، $CaAl_2O_4$ و $CaTiO_3$ در فصل مشترک آن‌ها تشکیل شده است. البته، مقدار β-TCP در نمونه‌ی B به‌دلیل وجود درصد بیش‌تری از هیدروکسی آپاتیت، بیش از نمونه‌ی A می‌باشد.



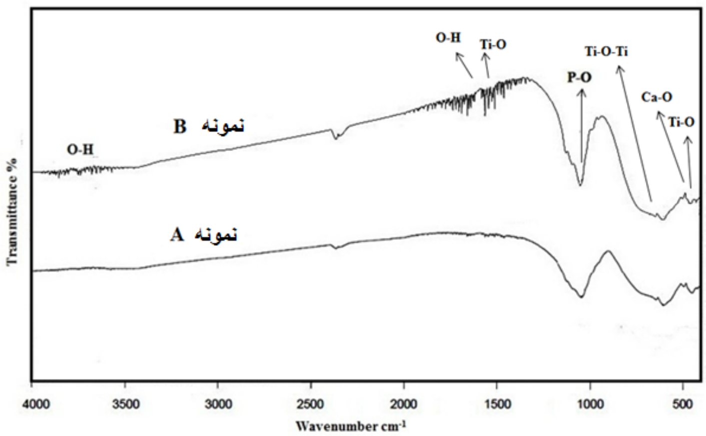
شکل ٤ الگوی پراش پرتوی ایکس نمونه‌های نانوبیوماده‌ی مرکب نمونه‌ی A (a) و نمونه‌ی B (b)

اگر چه هیدروکسی آپاتیت در محیط بدن ثابت و پایدار است، امّا حضور فازهای ثانویه باعث حل شدن آن و در نتیجه، تخریب قطعه‌ی کاشتنی در بدن موجود زنده می‌شود. بنابراین، افزایش دمای تف‌جوشی و به‌دنبال آن، افزایش بلورینگی، برای عمر بیش‌تر قطعه‌ی کاشتنی ضروری است [36]. از طرفی، دمای بالای تف‌جوشی $۸۰۰\ ^{\circ}C$ منجر به تجزیه‌ی هیدروکسی آپاتیت به β-TCP و α-$Ca_3(PO_4)_2$ می‌شود. حضور این مواد در ماده‌ی مرکب سبب کاهش زیست‌سازگاری قطعه‌ی کاشتی می‌شود. افزو بر این، β-TCP با قرارگیری نمونه‌ها در محیط‌های بیولوژیکی نظیر پلاسمای خون، ناپایدار است و به مرور زمان تخریب می‌شود. از این رو، دلیل افت استحکام ماده‌ی مرکب پس از قرارگیری در محلول SBF را می‌توان حضور این فاز دانست [36]. در این تحقیق، فاز β-TCP به مقدار ناچیز در ساختار هر دو نمونه‌ی نانوبیوماده‌ی مرکب در نتیجه‌ی حرارت‌دهی نمونه‌ها در دمای $۱۰۰۰\ ^{\circ}C$، مشاهده شد، ولی این مقدار نمی‌تواند تأثیر چندانی بر زیست‌سازگاری نمونه‌ها داشته باشد.

نانوآلومینا به‌عنوان بهترین ماده‌ی تقویت‌کننده در بیوسرامیک‌های هیدرکسی آپاتیت به‌شمار می‌رود. این ماده استحکام شکست و سختی ماده‌ی مرکب را

افزایش می‌دهد، ولی در فرایندهای دما بالا ($^{\circ}C$ ۱۴۰۰–۱۲۰۰) حین مراحل تولید به‌دلیل افزایش سطح و وسعت منطقه‌ی واکنش، فازهای جدیدی از جمله فاز آلومینات کلسیم ایجاد می‌شود که باعث افت خواص مکانیکی ماده‌ی مرکب می‌شود و کاربرد آن را محدود می‌کند [30]. در این مطالعه، به‌دلیل تف‌جوشی نمونه‌های نانوبیوماده‌ی مرکب در دمای $^{\circ}C$ ۱۰۰۰، فاز آلومینات کلسیم در ریزساختار به‌مقدار ناچیز مشاهده شد.

به‌منظور کسب اطمینان از انجام واکنش بین اجزای تشکیل‌دهنده‌ی نانوبیومواد مرکب، آزمون FTIR انجام شد. در شکل (۵)، طیف FTIR مربوط به نمونه‌های A و B در محدوده طول موج cm^{-1} ۴۰۰۰–۴۰۰ نشان داده شده است. حضور پهن‌ترین پیک در نمونه‌های A و B قبل از غوطه‌وری در محلول SBF، نشان‌دهنده‌ی وجود گروه‌های فسفاتی (پیوند کششی P-O) در طول موج cm^{-1} ۱۰۴۲ می‌باشد. وجود این پیک، حضور هیدروکسی آپاتایت را در نمونه‌های ماده‌ی مرکب را نشان می‌دهد [38]. پیک موجود در طول موج cm^{-1} ۱۰۴۲ در نمونه‌ی B، دارای دامنه‌ی بزرگ‌تری نسبت به نمونه‌ی A می‌باشد و این، وجود درصد بیش‌تری از هیدروکسی آپاتایت را در نمونه‌ی B ثابت می‌کند. افزون بر این، پیک‌های موجود در طول موج‌های cm^{-1} ۴۲۱، cm^{-1} ۴۵۰، cm^{-1} ۵۹۵، cm^{-1} ۱۴۱۳ و cm^{-1} ۱۴۸۳ در نمونه‌های A و B را می‌توان به گروه‌های Ti-O نسبت داد. پیک‌های ظاهر شده در طول موج‌های cm^{-1} ۴۱۰، cm^{-1} ۴۶۸، cm^{-1} ۵۰۰ و cm^{-1} ۶۸۰، به گروه‌های Ti-O-Ti مربوطند [39]. هم‌چنین، پیک مشاهده شده در طول موج cm^{-1} ۵۴۵ را می‌توان به Al-O-Al و پیک‌های موجود در طول موج‌های cm^{-1} ۶۰۲، cm^{-1} ۶۷۸ و cm^{-1} ۶۹۹ را به Al_2O_4 نسبت داد [40]. پیک مورد نظر در طول موج‌های cm^{-1} ۴۶۳ و cm^{-1} ۵۶۰ مربوط به Ca-O و پیک حاضر در طول موج cm^{-1} ۱۴۳۹ مربوط به Ca-OH می‌باشد. پیک‌های ظاهر شده در نزدیکی‌های طول موج‌های cm^{-1} ۱۶۵۰ و cm^{-1} ۳۵۷۰ نیز نشان‌دهنده‌ی حرکت‌های کششی یون‌های هیدروکسیل موجود در شبکه‌ی هیدروکسی آپاتایت می‌باشد [41].



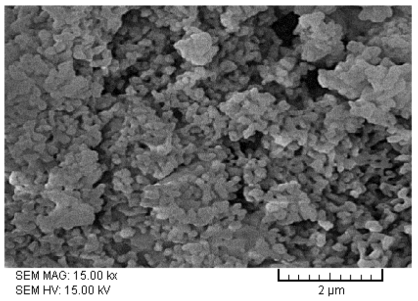
شکل ۵ طیف FTIR مربوط به نمونه‌های نانوبیومادهی مرکب

جدول ۵ درصد وزنی عناصر موجود در سطح نانوبیومواد مرکب پس از غوطه‌وری در محلول SBF

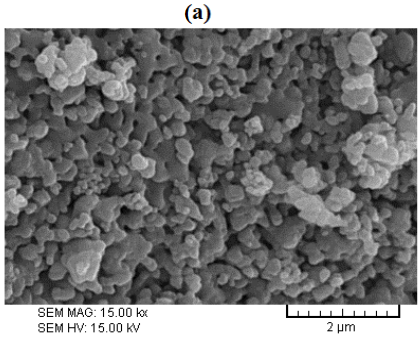
نمونه	Ca (%)	Ti (%)	O_2 (%)	P (%)	Al (%)
A	۱۸/۲۶	۲۰/۷۵	۴۷/۶۱	۹/۷۴	۳/۶۴
B	۲۵/۶	۸/۳۳	۴۹/۲۶	۱۴/۶۲	۲/۱۹

مطالعه زیست‌فعّالی و زیست‌سازگاری نمونه‌ها

رفتار زیست‌فعّالی و تشکیل فاز کلسیم فسفاتی بر روی سطح نانوبیو مواد مرکب در محلول SBF توسط میکروسکُپ SEM و آزمون ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS (EDX) ارزیابی شد. در شکل (٦)، تصویرهای SEM مربوط به نمونه‌های A و B پس از غوطه‌وری در محلول SBF نشان داده می‌شود. با بررسی نتایج غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول SBF، تشکیل جوانه‌های آپاتایت بر روی هر دو نمونه مشاهده می‌شود، امّا تفاوت چشم‌گیری در میزان توانایی تشکیل جوانه‌های آپاتیت در نمونه‌ی Bنسبت به نمونه‌ی A وجود دارد. درصد بیش‌تر هیدروکسی آپاتایت در نمونه‌ی B، دلیلی بر پوشانده شدن تمام سطح آن توسط جوانه‌های آپاتایت است، در حالی‌که این جوانه‌ها در نمونه‌ی A به‌طور پراکنده در نقاط مختلف تشکیل شده‌اند. اخیراً، محققان [42]، گزارش کرده‌اند که افزایش میزان هیدروکسی آپاتایت در ترکیبات مواد مرکب باعث ترغیب تشکیل جوانه‌های آپاتایت بر روی سطح نمونه‌ها درون محلول SBF می‌شود.



(a)

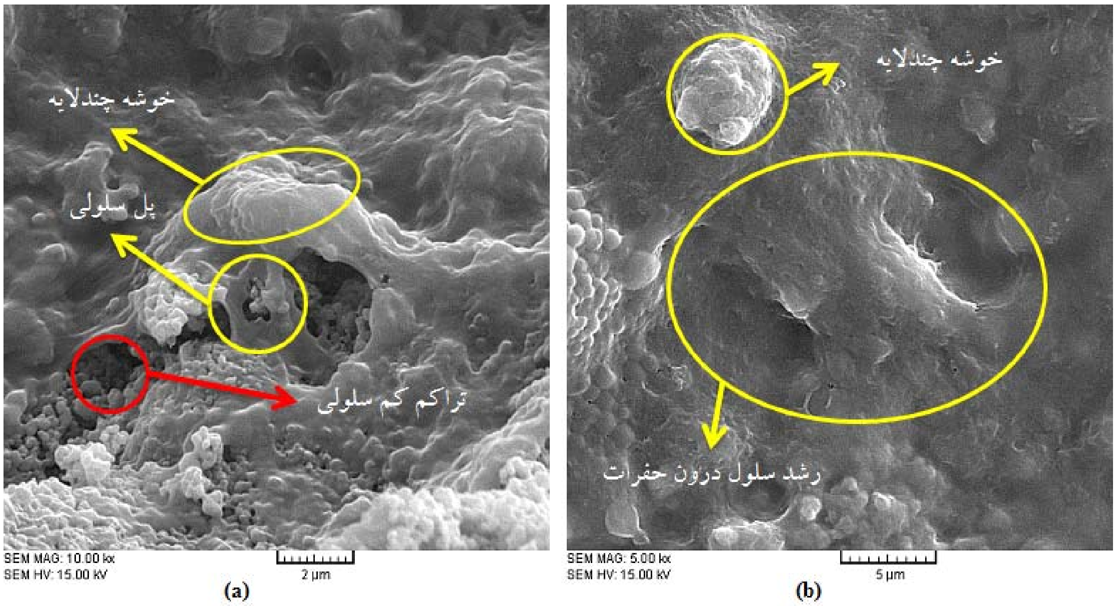


(b)

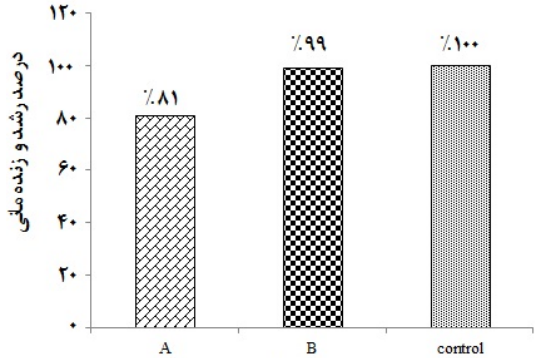
شکل ٦ تصویرهای SEM از نمونه‌ی A (a) و نمونه‌ی B (b) پس از غوطه‌وری در محلول SBF

زیست‌فعّالی بیوسرامیک‌ها به‌دلیل توانایی آن‌ها در تشکیل هیدروکسی آپاتایت در محیط‌های فیزیولوژیک (SBF) می‌باشد [43,44]. در این مطالعه، تشکیل آپاتایت و سایر انواع کلسیم فسفات بر روی نانوبیومواد مرکب سرامیکی ارزیابی شده است و ارتباط بین تشکیل آپاتایت و زیست فعّالی بیوسرامیک‌ها تعیین شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمون (EDX) (جدول ۵)، مشاهده می‌شود که میزان کلسیم و فسفر بعد از غوطه‌وری نمونه‌ها در مقایسه با قبل از غوطه‌وری آن‌ها در محلول SBF (جدول ۳)، به‌میزان چشم‌گیری افزایش یافته است و این در حالی است که نسبت کلسیم به فسفر در نمونه‌ها تغییر چندانی نکرده است. غلظت یون کلسیم از یک طرف با تشکیل لایه‌ی آپاتایت در محلول SBF و از سوی دیگر، با میزان رهایش آن از نمونه‌ی ماده‌ی مرکب کنترل می‌شود [45].

تصویرهای میکروسکُپ الکترونی روبشی در شکل (۷)، چسبندگی، رشد، پهن‌شوندگی و مُرفولوژی سلول‌های MG-67 بر روی نمونه‌ها را پس از ۳ روز کشت نشان می‌دهند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، سلول‌ها به‌خوبی در سطح هر دو نمونه گسترش یافته‌اند و سلول‌ها از طریق ترشحات ریز سلولی مثل فلوپدیا، به‌یکدیگر و به ماده‌ی زمینه چسبیده‌اند، با این تفاوت که سطح نمونه‌ی B با تعداد سلول‌های بیش‌تری نسبت به نمونه‌ی A و به‌طور کامل با سلول‌های دارای ترشحات فلوپدیای بزرگِ چسبیده به سطح پوشیده شده است. افزون بر این، رشد سلولی درون حفره‌های نمونه‌ی B رخ داده است، در حالی‌که بر روی سطح نمونه‌ی A، رشد سلولی کم‌تر است و سلول‌ها پراکنده‌اند. سلول‌ها بر روی تمام سطح نمونه‌ی A به‌دلیل بزرگ شدن حفره‌ها، به تلاقی کامل نرسیده‌اند. در این حالت، سلول‌ها بر روی سطح یک خوشه‌ی چند لایه پل ارتباطی تشکیل داده‌اند.



شکل ۷ تصویرهای میکروسکُپ الکترونی روبشی نشان‌دهنده‌ی مُرفولوژی سلول‌های MG-67 پس از ۳ روز کشت در نمونه‌ی A (a) و در نمونه‌ی B (b)



شکل ۸ نتایج آزمون MTT مربوط به سلول‌های MG-67 پس از ۳ روز کشت بر روی نمونه‌ها

برای تعیین کمّی تکثیر سلول‌های استخوانی در هر دو نمونه‌ی A و B، آزمون MTT انجام شد. در شکل (۸)، درصد زنده‌مانی سلول‌ها در نمونه‌ها پس از ۳ روز کشت نشان داده شده است. در مدّت زمان کشت، تکثیر سلول‌های بیش‌تری بر روی نمونه‌ی B در مقایسه با نمونه‌ی A مشاهده شد. درصد رشد و زنده ماندن سلول‌ها بر روی سطح نمونه‌ی B با بیش‌ترین میزان تخلخل، ۹۹ درصد و در روی سطح نمونه‌ی A برابر با ۸۱ محاسبه شد. نتایج به‌دست آمده بیان‌گر زیست‌سازگاری عالی هر دو نمونه با توجه به تکثیر ۱۰۰ درصدی نمونه‌ی کنترل منفی هستند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نانوبیومادهی مرکب TiO_2-Al_2O_3-HA با خواص مطلوب به‌روش فشردن سرد و تف‌جوشی ساخته شد. افزون بر این، تشکیل فازهایی از نوع کلسیم فسفات بر روی سطح نانوبیومواد مرکب در محلول SBF بررسی شد. بر روی سطح نمونه‌ی B، درصد وزنی بیش‌تری از هیدروکسی آپاتایت و فازهای نوع کلسیم فسفات نسبت به نمونه‌ی A تشکیل شد. ایجاد سطحی بدون ریزترک، کاهش احتمال ایجاد فازهای جدید از جمله $CaAl_2O_4$ و β-TCP و جلوگیری از ایجاد فاز α-$Ca_3(PO_4)_2$، از دیگر نتایج

این مطالعه می‌باشند. افزون بر این، استحکام فشاری نمونه‌ی A بیش از نمونه‌ی B و مدول یانگ آن تقریباً ۱/۵ برابر بزرگ‌تر از نمونه‌ی B بود. نتایج آزمون برون تنی in vitro نشان دادند که سلول‌ها بر روی سطح هر دو نمونه پس از ۳ روز به‌شکلی مطلوب پهن شده‌اند، با این تفاوت که بیش‌ترین رشد سلولی بر روی سطح نمونه‌ی B رخ داده بود. بنابراین، نتایج آزمون تعیین میزان سمیّت سلولی، بیان‌گر زیست‌سازگاری عالی نمونه‌های A و B و توانایی بهبود چسبندگی و تکثیر سلولی بودند. به‌این ترتیب، نشان داده شد که هر دو نانوبیومادهٔی مرکب با توجه به خواص متفاوتی که دارند، می‌توانند برای کاربردهای متفاوت اُرتوپدی و دندانپزشکی مفید باشند. بنابراین، نمونه‌ی B با داشتن زیست‌فعّالی مناسب برای ماده‌ی کاشتی، می‌تواند در مناطقی که نیاز به بهبود فرایند استخوان‌سازی، تثبیت قطعه‌ی کاشتنی، پرکننده استخوان و افزایش چسبندگی بیوماده‌ی مرکب به استخوان می‌باشد، به‌کار برده شود. این در حالی است که نمونه‌ی A در مناطقی که نیاز به پوشش به‌منظور افزایش زیست‌سازگاری، چسبندگی و استحکام ماده‌ی کاشتنی می‌باشد، می‌تواند استفاده شود.

قدردانی و تشکر

نویسندگان این مقاله، از مدیریّت و کارکنان آزمایشگاه مواد گروه متالورژی و مکانیک در دانشگاه آزاد واحد یزد، به‌دلیل حمایت از انجام این کار تحقیقاتی و همکاری در انجام آزمایش‌ها، تشکر می‌نمایند.

مراجع

1. Dorozhkin, S.V., "Bioceramics of calcium orthophosphates", Biomaterials., Vol. 31, pp. 1465-1485, (2010).
2. Bellucci, D., Cannillo, V., Sola, A., Chiellini, F., and Gazzarri, M., Migone, C., "Macroporous Bioglass®-derived scaffolds for bone tissue regeneration", Ceramics International., Vol. 37, pp. 1575-1585, (2011).
3. Lee , S.-H., and Shin,H., "Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering", Advanced Drug Delivery Reviews., Vol. 59, pp. 339-359, (2007).
4. Uemura, T., Dong, J., Wang, Y., Kojima, H., Saito, T., Iejima, D., Kikuchi, M., Tanaka, J., and Tateishi, T., "Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques", Biomaterials., Vol. 24, pp. 2277-2286, (2003).
5. Yoneda, M., Terai, H., Imai, Y., Okada, T., Nozaki, K., Inoue, H., Miyamoto, S., and Takaoka, K., "Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant", Biomaterials., Vol. 26, pp. 5145-5152, (2005).
6. Olszta, M.J., Cheng, X., Jee, S.S., Kumar, R., Kim, Y.-Y., Kaufman, M.J., Douglas, E.P., and Gower, L.B., "Bone structure and formation: A new perspective", Materials Science and Engineering: R: Reports., Vol. 58, pp. 77-116, (2007).
7. Sun, F., Zhou, H., and Lee, J., "Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration", Acta Biomaterialia., Vol. 7, pp. 3813-3828, (2011).
8. Nandakumar, A., Cruz, C., Mentink, A., Tahmasebi Birgani, Z., Moroni, L., van Blitterswijk, C., and

Habibovic, P., "Monolithic and assembled polymer–ceramic composites for bone regeneration", Acta Biomaterialia., Vol. 9, pp. 5708-5717, (2013).

9. Chen, Q.Z., Wong, C.T., Lu, W.W., Cheung, K.M.C., Leong ,J.C.Y., and Luk, K.D.K., "Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo", Biomaterials., Vol. 25, pp. 4243-4254, (2004).
10. Rath, P.C., Besra,L., Singh, B.P., and Bhattacharjee, S., "Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition: Characterization and corrosion studies", Ceramics International., Vol. 38, pp. 3209-3216, (2012).
11. Swetha, M., Sahithi, K., Moorthi, A., Srinivasan, N., Ramasamy, K., and Selvamurugan, N., "Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules,* Vol. 47, pp. 1-4, (2010).
12. Zhou, H., and Lee, J., "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering", Acta Biomaterialia, Vol. 7, pp. 2769-2781, (2011).
13. Balani, K., Anderson, R., Laha, T., Andara, M., Tercero, J., Crumpler, E., and Agarwal, A., "Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro", Biomaterials, Vol. 28, pp. 618-624, (2007).
14. Sadat-Shojai, M., Atai, M., Nodehi, A., and Khanlar, L.N., "Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application", Dental Materials., Vol. 26, pp. 471-482, (2010).
15. Sato, M., Sambito, M.A., Aslani, A., Kalkhoran, N.M., Slamovich, E.B., and Webster, T.J., "Increased osteoblast functions on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium", Biomaterials, Vol. 27, pp. 2358-2369, (2006).
16. Topić, M., Ntsoane, T., and Heimann, R.B., "Microstructural characterisation and stress determination in as- plasma sprayed and incubated bioconductive hydroxyapatite coatings", Surface and Coatings Technology, Vol. 201, pp. 3633-3641, (2006).
17. Khosroshahi, M.E., Mahmoodi, M., and Saeedinasab, H., "In vitro and in vivo studies of osteoblast cell response to a titanium-6 aluminium-4 vanadium surface modified by neodymium:yttrium–aluminium–garnet laser and silicon carbide paper", Lasers Med Sci, Vol. 24, pp. 925-939, (2009).
18. Khosroshahi, M.E., Tavakoli, J., and Mahmoodi, M., "Analysis of Bioadhesivity of Osteoblast Cells on Titanium Alloy Surface Modified by Nd:YAG Laser", *J Adhes.,* Vol. 83, pp. 151-172, (2007).
19. Aminzare, M., Eskandari, A., Baroonian, M.H., Berenov, Razavi Hesabi, A. Z., Taheri, M., and Sadrnezhaad, S.K., "Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties", Ceramics International, Vol. 39, pp. 2197-2206, (2013).
20. Andronescu, E., "Ceramics in substitutive and reconstructive surgery: Edited: P. Vincenzini, Faenza, Italy Materials Science Monographs Volume 69 Publisher: Elsevier Science Publisher, Sara

Burgerhartstraat 25, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam The Nederlands, (ISBN 0-444-89060-2)", Microelectronics Reliability., Vol. 33, pp. 767, (1993).

21. Kalmodia, S., Goenka, S., Laha, T., Lahiri, D., Basu, B., and Balani, K., "Microstructure, mechanical properties, and in vitro biocompatibility of spark plasma sintered hydroxyapatite–aluminum oxide–carbon nanotube composite", Materials Science and Engineering: C, Vol. 30, pp. 1162–1169, (2010).
22. Kratschmer, T., and Aneziris, C.G., "Amorphous zones in flame sprayed alumina–titania–zirconia compounds", Ceramics International., Vol. 37, pp. 181-188, (2011).
23. Wen, C.E., Xu, W., Hu, W.Y., and Hodgson, P.D., "Hydroxyapatite/titania sol–gel coatings on titanium– zirconium alloy for biomedical applications", Acta Biomaterialia., Vol. 3, pp. 403-410, (2007).
24. Sopyan, I., Fadli, A., and Mel, M., "Porous alumina–hydroxyapatite composites through protein foaming – consolidation method", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.,* Vol. 8, pp. 86-98, (2012).
25. Cho, J., Schaab, S., Roether, J., and Boccaccini, A., "Nanostructured carbon nanotube/TiO2 composite coatings using electrophoretic deposition (EPD)", *J Nanopart Res.,* Vol. 10, pp. 99-105, (2008).
26. Beherei, H.H., Mohamed, K.R., and El-Bassyouni, G.T., "Fabrication and characterization of bioactive glass (45S5)/titania biocomposites", Ceramics International., Vol. 35, pp. 1991-1997, (2009).
27. Ning, M., Xinfei, F., Xie, Q., and Yaobin, Z., "Ag–TiO2/HAP/Al2O3 bioceramic composite membrane: Fabrication, characterization and bactericidal activity", *Journal of Membrane Science,* Vol. 336, pp. 109–117, (2009).
28. Habibpanah, A.A., Pourhashem, S., and Sarpoolaky, H., "Preparation and characterization of photocatalytic titania– alumina composite membranes by sol–gel methods", *Journal of the European Ceramic Society.,* Vol. 31, pp. 2867-2875, (2011).
29. Enayati-Jazi, M., Solati-Hashjin, M., Nemati, A., and Bakhshi, F., "Synthesis and characterization of hydroxyapatite/titania nanocomposites using in situ precipitation technique", Superlattices and Microstructures., Vol. 51, pp. 877-885, (2012).
30. Viswanath, B., and Ravishankar, N., "Interfacial reactions in hydroxyapatite/alumina nanocomposites", Scripta Materialia., Vol. 55, pp. 863-866, (2006).
31. Wan, Y., Wu, H., Cao, X., and Dalai, S., "Compressive mechanical properties and biodegradability ofporous poly(caprolactone)/chitosan scaffolds", Polymer Degradation and Stability., Vol. 93, pp. 1736-1741, (2008).

32. David, B., Pizúrová, N., Schneeweiss, O., Klementová, M., Šantavá, E., Dumitrache, F., Alexandrescu, R., and Morjan, I., "Magnetic properties of nanometric Fe-based particles obtained by laser-driven pyrolysis", *Journal of Physics and Chemistry of Solids.,* Vol. 68, pp. 1152-1156, (2007).

33. Kokubo, T., Kim, H.M., Miyaji, F., Takadama, H., and Miyazaki, T., "Ceramic–metal and ceramic–polymer composites prepared by a biomimetic process", Composites Part A: Applied Science and Manufac., Vol. 30, pp. 405-409, (1999).

34. Kim, H., Kong, Y., Bae, C., Noh, Y., and Kim, H., "Sol–gel derived fluor-hydroxyapatite biocoatings on zirconia substrate", Biomaterials., Vol. 25, pp. 2919-2926, (2004).

35. Huang, Y., Hsiao, P., and Chai, H., "Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells", Ceramics International., Vol. 37 , pp. 1825-1831, (2011).

36. Kwok, C.T., Wong, P.K., Cheng, F.T., and Man, H.C., "Characterization and corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V fabricated by electrophoretic deposition", Applied Surface Science., Vol. 255, pp. 6736-6744, (2009).

37. Harle, J., Kim, H.-W., Mordan, N., Knowles, J.C., and Salih, V., "Initial responses of human osteoblasts to sol–gel modified titanium with hydroxyapatite and titania composition", Acta Biomaterialia., Vol. 2, pp. 547-556, (2006).

38. Salehi, S., and Fathi, M.H., "Fabrication and characterization of sol-gel derived hydroxyapatite/zirconia composite nanopowders with various yttria contents", Ceram Int., Vol. 36, pp. 1659-1667, (2010).

39. Cordeiro, D., Vasconcelos,L., and Costa, V., "Infrared Spectroscopy of Titania Sol-Gel Coatings on 316L Stainless Steel", Materials Sciences and Applications.,Vol. 2, pp. 1375-1382, (2011).

40. Kumara ,K., Singhb,A.K., and Rai, S.B., "Laser excited long lasting luminescence in $CaAl_2O_4$:Eu^{3+}/Eu^{2+}+Nd^{3+}phosphor",Spectrochimica Acta Part A: Molecular andBiomolecular Spectroscopy., Vol. 102, pp. 212-218, (2013).

41. Barinov, S.M., Rau, J.V., Cesaro, S.N., and Durisin, J., "Carbonate Release from Carbonated Hydroxyapatite in the Wide Temperature Rage", *Journal of Materials Science Materials in Medicine.,* Vol. 17, pp. 597-604, (2006).

42. Kong, L., Gao,Y., Lu,G., Gong,Y., Zhao, N., and Zhang, X., "A study on the bioactivity of chitosan/nano- hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *European Polymer Journal.,* Vol. 42, pp. 3171-3179, (2006).

43. Fujibayashi, S., Neo, M., Kim, H.-M., Kokubo, T., and Nakamura, T., "A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na_2O–CaO–SiO_2 glasses", Biomaterials., Vol. 24, pp. 1349-1356, (2003).

44. Rámila, A., and Vallet-Regí, M., "Static and dynamic in vitro study of a sol–gel glass bioactivity", Biomaterials., Vol. 22, pp. 2301-2306, (2001).

45. Martínez, A., Izquierdo-Barba, I., and Vallet-Regí, M., "Bioactivity of a $CaO-SiO_2$ Binary Glasses System", Chemistry of Materials., Vol. 12, pp. 3080-3088, (2000).